

Calcium Alginate 에 포괄된 Yeast Invertase 의 고정화 효소에 관한 연구 (I . 효소 생산의 최적 조건)

방병호 · 이상건 · 양철영

서울보건전문대학 부설 한국보건과학연구소

(1989. 9.30 수리)

Calcium Alginate-entrapped Yeast Whole-cell Invertase I . Optimum Conditions of Invertase Production

Bang, Byung Ho, Sang-Gun, Lee and Cheul-young, Yang

*Korea Institute of Health Research, Seoul Health
Junior College, Seoul Korea*

(Received September, 30, 1989)

ABSTRACT

A strain of *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 was found to produce a strong sucrose-hydrolyzing enzyme. Using this strain, the optimal culture conditions for the production of invertase were investigated. The results are as follows :

1. For enzyme production, optimal temperature, initial pH and critical concentrations of sucrose and raffinose were 30°C, 5.0 and 3.0%, respectively.
2. Enzyme production was reached maximum by organic nitrogen source, 0.3% yeast extract plus 0.5% bactopectone.
3. It was appeared the presence of 0.1 M Mn^{2+} and Fe^{2+} ion was essential factors, on the other hand, 0.1 M Ag^+ and Hg^{2+} ion almost block in yeast growth and enzyme production.
4. Invertase productivity was reached maximum within 3 days on stationary culture with medium-composed of sucrose 3%, bactopectone 0.5%, yeast extract 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.05%.

I. 서 론

식품공업에서 설탕은 그 사용량이 대단히 많다. 그러나 설탕의 지나친 섭취가 인체에 대해서 여러 가지 좋지 않은 영향을 미쳐서 가급적이면 설탕의 사용량을 줄이려는 노력을 부단히 하고 있다. 그 중 설탕을 포도당과 과당으로 가수분해한 용액은 감도가 증대됨은 물론이고, 삼투압이 높아짐으로 인해서 비점이 높아지고 빙점이 더욱 낮아지는 물성적인 장점이 생기기 때문에 산처리, 이온교환법, 또는 invertase 를 이용한 효소적 분해로 설탕을 가수분해하여 사용하는 방법이 개발되고 있다¹⁾. 그렇지만 산처리나 이온교환법으로는 부산물이 많이 생성되는 단점이 있어서 그러한 결점이 없는 효소적 전환 (enzymatic inversion)의 필요성이 강력히 대두되어 연구 개발되고 있다²⁾.

그러나 유리의 효소를 사용한다면 공업적인 사용에 있어서 기술적인 여러가지 난점이 대두되고 비용이 많이 든다는 단점이 발생하게 된다. 그런데 invertase 를 생성하는 일부 효모는 세포에 결합된 상태 (cell bounded)로 분비된다고 알려져 있기 때문에 invertase 를 강력히 생산하는 효모균주를 분리하여 지지체를 사용하여 고정화 (immobilization) 한다면 분해산물과 효소와의 분리의 용이성, 반응시간의 단축, 연속적인 처리, 생산가의 저하 등의 효과가 있다³⁻⁸⁾.

본 연구에서는 invertase 를 생산 분비하는 효모균주를 stock cultures 또는 자연계로부터 분리 선별하여, 1차 선별된 균주 중에서 균체 외부에 결합된 상태로 다량의 효소를 분비하는 균주를 2차 선별한 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 을 이용한 batch culture 로 여러가지 생산 조건을 검토한 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 유용균주의 선별

본 연구에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* 로서 서울, 경기, 강원도 일원에서 채취한 식물의 수액, 꽃의 화분 등을 시료로 하여 sucrose 5%, yeast extract 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 0.05%, agar 1.8% 조성의 배지 (pH 5.0)를 사용하여 분리한 각종 효모 572 균주를 대상으로 하여 액체배양을 한 후 invertase 활성을 가지는 균주 75 주를 1차 선별하였으며, sucrose 3%, malt extract 1%, yeast extract 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% 조성의 배지 (pH 5.0)를 사용하여 250 ml Erlenmeyer flask 에 40 ml 씩 분주한 다음 고압멸균후 30°C 에서 3일간 정지 배양하여 균체를 원심집적, invertase 활성이 가장 우수한 균주 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 을 얻었다.

2. 효소활성도의 측정

효소활성도는 배양현탁액 0.5 ml 과 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) 1 ml 그리고 0.2 M sucrose 용액 0.5 ml 를 혼합한 반응액을 30°C 에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS 법⁹⁾으로 정량하였다. 즉 반응여과액 0.5 ml 에 DNS 시약 0.5 ml 을 가하고 끓는 물에 5분간 증탕한 뒤 실온에서 식히고 증류수 10 ml 를 희석하여 spectrophotometer 540 nm 에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 상대치 (relative activity)로 나타내었다. 본 실험에 사용한 DNS 시약의 조성은 다음과 같다.

2% NaOH 2 l 에 DNS 40 g, phenol 8 g, Na_2SO_3 2 g, 그리고 Rochelle salt 800 g 을 녹이고 최종적으로 2% NaOH 용액을 채워 4 l 로 하였다.

3. 효소생산배지 및 배양방법

분리·선별된 효모 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 을 이용한 invertase 생산 최적조건을 위한 기본배지 (pH 5.0)로 sucrose 3%, malt

extract 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% 로 조성된 배지를 사용하였다. 탄소원의 영향을 조사할 경우 sucrose 대신에 각종 탄소원을 3% 농도로 하여, 질소원의 경우 malt extract 와 yeast extract 대신에 각종 유기질소원은 1%, 무기질소원은 0.5% 농도로 가하여, 금속이온의 경우에는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 대신에 각종 금속염을 0.1 mM 농도로 가하여 검토하였다. 그리고 배양방법은 기본배지 20 ml 를 100 ml Erlenmeyer flask 에 분주하여 121°C 에서 15 분간 멸균후 종균을 1 백금이씩 접종하여 30°C 에서 3 일간 정치 배양하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 배양온도의 영향

배양온도가 효소의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균을 접종한 후 20, 25, 30, 35, 40°C 의 배양기에서 3 일간 정치배양한 다음 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1 과 같았다. 즉 30°C 부근에서 균의 증식 및 효소생산량이 가장 많았다.

2. 초기 pH 의 영향

효소생산용 기초배지의 초기 pH 를 3.0 에서

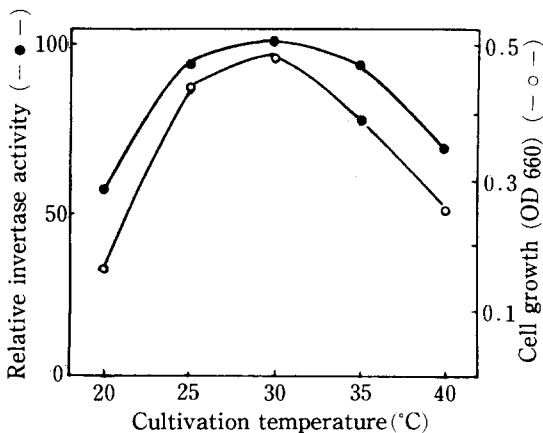


Fig. 1. Effect of cultivation temperature on the enzyme production.

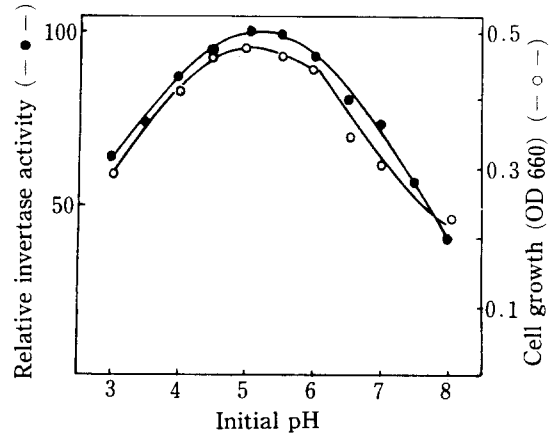


Fig. 2. Effect of initial pH on the enzyme production.

8.0 까지 1 N-HCl 과 NaOH 로 조절한 후 30°C 에서 3 일간 정치배양한 다음 효소생산량을 측정 한 결과를 Fig. 2 에서 보는 바와 같이 pH 5.0 부근에서 효소 생산과 균체증식이 가장 양호하였다.

3. 탄소원의 영향

효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 여러가지 탄소원을 기초배지에 3% 농도로 첨가하여 배양한 결과는 Table 1 에서 보는 바와 같이 sucrose 와 raffinose 를 첨가한 경우에서 가장 우수하였고 maltose 의 경우에도 생산량이 좀 많았다. 그러나 glucose, fructose 등의 단당류를 첨가하였을 경우에는 효소생산량이

Table 1. Effect of carbon source on the enzyme production

Carbon source	Cell growth (OD 660)	Relative activity
Glucose	0.45	18
Fructose	0.42	21
Galactose	0.38	26
Mannose	0.41	20
Maltose	0.47	87
Sucrose	0.42	100
Raffinose	0.37	99

낮았기 때문에 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 균주가 invertase 를 생합성할 때 catabolite repression 을 받는 것으로 생각된다⁵⁻⁷⁾. 그리고 sucrose 농도별로 조사해 본 결과는 Fig. 3 에서와 같이 2%를 첨가하는 것이 제일 적당하였다. 그러나 균체량은 sucrose 농도가 높아질수록 증가하였다.

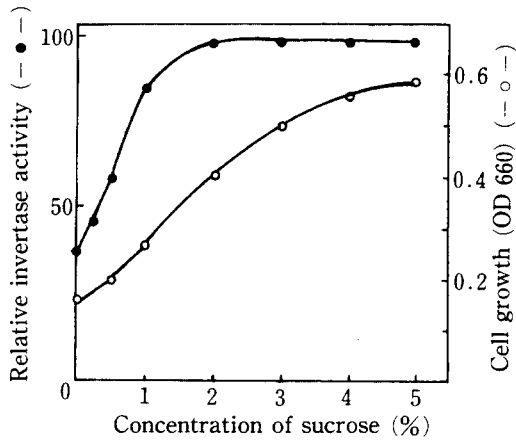


Fig. 3. Effect of concentration of sucrose on the enzyme production.

4. 질소원의 영향

효소생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 sucrose 2%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% 조성의 배지(pH 5.0)에 각종 질소원을 0.5~1% 되게 첨가하여 효소생산량을 조사한 결과는 Table 2 와 같다. 즉 대부분의 유기질소원의 경우에는 균의 증식과 효소생성이 왕성하였으나 무기질소원의 경우에는 균의 증식 및 효모 생산량이 낮았다. 그리고 유기질소원 중에서는 yeast extract 와 bactopectone 을 혼합해서 첨가한 경우가 가장 좋았으며 yeast extract 와 malt extract 를 혼합해서 첨가한 경우에도 효소생산량이 양호하였다. 그리고 yeast extract 와 bactopectone 의 최적농도를 검토한 결과는 Table 3 과 같이 bactopectone 0.5% 와 yeast extract 0.3% 농도의 경우가 가장 적합하였다.

5. 금속이온의 영향

기초배지의 Mg^{2+} 대신에 각종 금속이온을 0.1 mM 농도로 첨가하여 효소생산량을 측정해본 결

Table 2. Effect of nitrogen source on the enzyme production

Nitrogen source	Cell growth(OD 660)	Relative activity(%)
Yeast extract	0.57	92
Malt extract	0.49	89
Beef extract	0.50	85
Bactopectone	0.53	90
Tryptone	0.48	87
Yeast extract-malt extract	0.54	96
Yeast extract-bactopectone	0.55	100
Yeast extract-beef extract	0.50	92
Yeast extract-tryptone	0.52	90
Malt extract-bactopectone	0.56	93
Malt extract-beef extract	0.52	92
Malt extract-tryptone	0.55	90
Inorganic nitrogen compound (NH_4NO_3 , (NH_4) ₂ SO ₄ , NH_4Cl , (NH_4) ₂ HPO ₄ , $NaNO_3$)	0.02~0.11	2~17

과는 Table 4에서와 같이 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 등을 비롯한 많은 금속이온의 경우에서 별로 차이가 없었으나 Ag^+ , Hg^{2+} 등의 중금속의 경우에는 효소생산을 저해하였다.

Table 3. Effect of concentration of yeast extract and bactopectone

Bactopectone (%)	Yeast extract (%)				
	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
0.1	79*	82	86	87	85
0.2	83	85	90	92	87
0.3	87	90	93	90	87
0.5	90	96	100	100	90
1.0	91	94	97	96	89

* : Enzyme activity was revealed as relative activity

Table 4. Effect of metal ion on the enzyme production

Metal ion	Cell growth (OD 660)	Relative activity (%)
Ag^+	0.03	3
Ca^{2+}	0.52	96
CO^{2+}	0.50	89
Cu^{2+}	0.47	87
Fe^{2+}	0.54	98
Hg^{2+}	0.12	14
Mg^{2+}	0.56	100
Mn^{2+}	0.62	99
Pb^{2+}	0.35	53
Zn^{2+}	0.50	95

6. 배양시간에 따른 효소생산

Sucrose 2%, bactopectone 0.5%, yeast extract 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 초기 pH 5.0의 배지를 사용하여 30°C에서 배양하면서 경시적으로 균의 증식 및 효소 생산량을 측정하여 본 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 60시간 정도 배양하는 것이 제일 적당하였다.

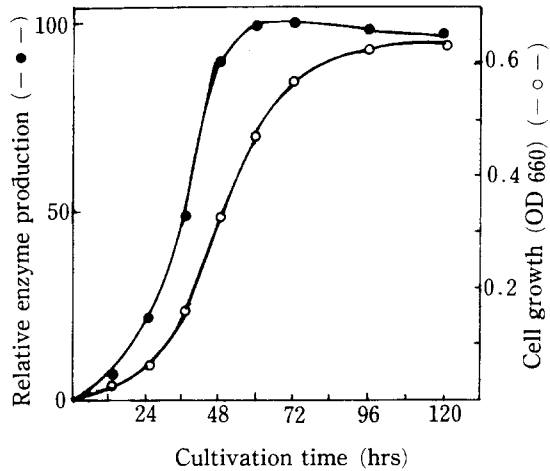


Fig. 4. Cultural characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* BY-336.

IV. 요약

효모균원으로부터 invertase의 생산력이 강한 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366을 분리하였다. 이 균을 이용하여 효소생산을 위한 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 최적온도는 30°C로 나타났다.
2. 초기 pH는 5.0이었다.
3. 탄소원으로는 3%의 sucrose와 raffinose가 가장 좋았다.
4. 질소원으로는 유기질소원인 yeast extract 0.3%와 bactopectone 0.5%를 혼합사용하는 것이 가장 좋았다.
5. 각종 금속이온 중 Mn^{2+} , Fe^{2+} 는 Mg^{2+} 와 같은 효과를 보였고, Ag^+ 와 Hg^{2+} 등의 중금속의 경우는 본 효소의 생산을 저해하였다.
6. Sucrose 2%, bactopectone 0.5%, yeast extract 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 초기 pH 5.0의 배지로 3일 이상 정치 배양하면 본 효모에 의한 invertase 생산량은 최고에 달하였다.

V. 참고문헌

1. Bugbee, W.M. : *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1326-1329(1984).
2. Crueger, A., and W. Crueger : "Biochemistry" (H. J. Rehm and G. Reed ed.) Vol. 6 A, pp 421-457, Verlag Chemie, Weinheim (1984).
3. Wiseman, A. : "Topics in enzyme and fermentation biotechnology" Vol.3, ed. A. Wiseman, pp. 267-288, Ellis Horwood Ltd. (1979).
4. Scott, C.D. : *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 66-73(1987).
5. Mormeneo, S., and R. Sentandreu : *J. Bacteriol.*, **152**, 14-18(1982).
6. Chu, F.K., and F. Maley : *J. Biol. Chem.*, **255**, 6392-6397(1980).
7. Mortatta, M.P.L., H.H. Sato and Y.K. Park : *Biotechnol. Lett.*, **5**, 229-232(1983).
8. Vitolo, M., M.L.R. Vairo and W. Borzani : *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 9-14(1987).
9. Hostettler, F., E. Borel and H. Deuel : *Helv. Chem. Acta.*, **257**, 2132-2139 (1951).